DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.030
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
318 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

# 论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0318-03

## 雌激素对下丘脑神经元结构及雌激素受体表达水平的影响

常 青[1],应大君[2],史常旭[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院妇产科;[2]基础医学部解剖学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 观察应用雌激素后老年前期雌性大鼠视前内侧区、弓状核雌激素受体的变化及神经元超微结构的改变。方法 采用免疫组织化学及电镜观察。结果 应用雌激素后视前内侧区、弓状核雌激素受体免疫反应(ER-IR)的表达明显下降,神经元核仁边移、核膜皱折,突触丰富、突触内分泌小泡增多。结论 雌激素可调节下丘脑心血管中枢视前内侧区、弓状核雌激素受体的变化影响神经元的结构及功能。

关键词:雌激素;下丘脑;雌激素受体;超微结构
中图法分类号:R322.81;R347.913 文献标识码:A

## Effects of estrogen on neuron structure and expression of estrogen receptor in hypothalamus

CHANG Qing, YING Da-jun, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To explore the changes of ER-IR and the ultra structure in the medial preoptic area, arcuate nuclei of early-aged mice treated with estrogen. **Methods** Immunohistochemistry assay and electron microscopy were used in this study. **Results** ER-IR in the medical preoptic area and arcuate nuclei were greatly reduced after estrogen was given. The cell nuclei of neurons in these areas migrated towards the side, the nuclear membrane became folded, synapse became richer, and the number of synapse vesicle increased. **Conclusion** Estrogen can affect the neuron structure and function through the change of estrogen receptor expression in the medial preoptic area and arcuate nuclei of the hypothalamus cardiovascular center.

**Key words**: estrogen; hypothalamus; estrogen receptor; microscopic structure

雌激素主要通过与雌激素受体(Estrogen receptor, ER)结合发挥雌激素作用[1]。在下丘脑ER分布广泛提示雌激素可直接作用于下丘脑影响神经元结构功能[2~5]。下丘脑为心血管的高级中枢,雌激素对心血管保护作用是否有下丘脑心血管中枢的作用,研究不多。为此,我们利用老年前期雌性大鼠建立围绝经期内分泌紊乱模型,研究应用雌激素后弓状核、视前内侧区雌激素受体免疫反应(Estrogen receptor immunoreaction, ER-IR)表达的变化及神经元超微结构的改变,了解雌激素对下丘脑弓状核、视前内侧区的影响。为进一步探讨雌激素对心血管保护作用机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立

老年前期大鼠:16月Wistar雌性大鼠作阴道细胞学涂上皮细胞成熟指数。大鼠发情周期短,规律性强,4~5 d 1个周期。采用连续阴道细胞学涂片可发现规律性变化。当出现动情周期长、随后持续动情1~2月。碱性美蓝染色观察阴道涂片、反复假妊娠时,确认为进入老年前期。

18月龄标准级Wistar雌性大鼠20只,重300~350 g(动物均购自重庆市中药研究所)。随机分为2组,每组10只,治疗组分别予以苯甲酸雌二醇(Estradiol benzoate, EB)皮下注射。对照组注射等量的灭菌水。根据参考文献[6]用药剂量为:EB 100 μg/100 g体重,每周2次腹部皮下注射。

### 1.2 组织样本的取材与检测

1.2.1 ER免疫组化检测染色方法及阳性标准判断 动物麻醉后,从升主动脉插管,37 ℃肝素等渗盐水100 ml冲洗后,予以4%多聚甲醛(在0.1 mol/L PBS pH 7.3中)300 ml灌注固定。脑组织块取视交叉至桥脑部分,恒冷箱冠状连续切片,片厚30 μm每5片取1片常规Nissl染色。按参考文献[8]进行核团定位。取视前内侧区、弓状核脑片,采用S-P法作ER检测。切片经0.01 mol/L PBS(pH 7.3),0.2% Triton X-100及0.1%牛血清蛋白PBS(0.01 mol/L pH 7.3)后,37 ℃孵育40 min,正常山羊血清37 ℃ 40 min,鼠抗ER血清(Santa Cruz公司1∶100)37 ℃ 1 h,4 ℃ 72 h,漂洗后入生物素标记的二抗(1∶150),4 ℃ 24 h,漂洗后入过氧化酶标记的链霉卵白素(1∶150),4 ℃ 24 h,孵育切片以DAB显色至适度,明胶裱片,中性树胶封片。

阴性对照:用正常山羊血清替代一抗反应。

1.2.2 透射电镜样本制备及观察 动物在体灌注固定同上。按组别分别取视前内侧区、弓状核,置于预冷的2.5%戊二醛磷酸缓冲液(0.2 mol/L PBS, pH 7.4)中,常规包埋,作超薄切片,透射电镜观察。

图像分析:每只动物选择5张切片,脑切片按核团定位任选取5个视野检测,检测脑片免疫组化结果的积分光密度(IOD),反应阳性物的面积(Area)。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 6.0-for windows软件进行 $t$ 检验,数据相关分析等。

作者简介:常 青(1963-),女,湖南省长沙市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事妇科内分泌方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68754409

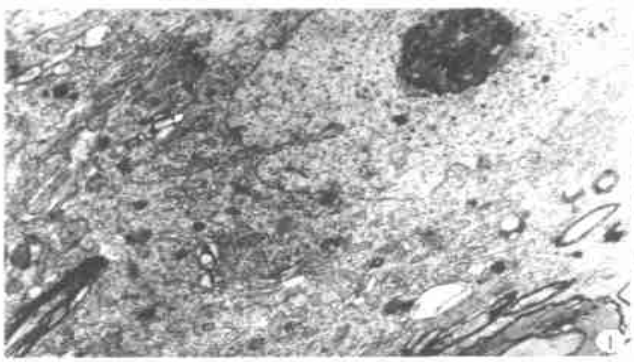
收稿日期:2000-07-18;修回日期:2000-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2　结果

### 2.1　视前内侧区、弓状核的电镜观察

透射电镜观察发现, 对照组视前内侧区神经元胞浆内可见脂褐素分布, 神经元周围神经毡部位见突触及突触小泡, 见图 1。EB 组神经元核膜出现皱折, 与对照组比较细胞周围突触明显增多。神经毡部位突触小泡较对照组明显丰富, 突触内含大量分泌小泡, 见图 2。对照组弓状核神经元可见多聚核蛋白体, 神经元胞质内发现脂褐素颗粒。EB 组弓状核神经元游离核糖体多, 突触增多, 且突触小泡丰富。提示该部分神经元功能旺盛。



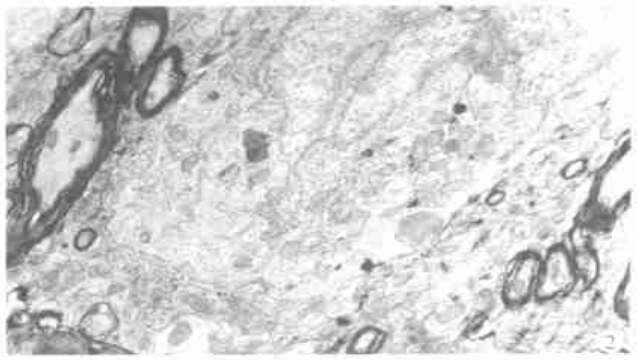


图 1　对照组: 视前内侧区神经元周围突触分布　(TEM× 5 000)

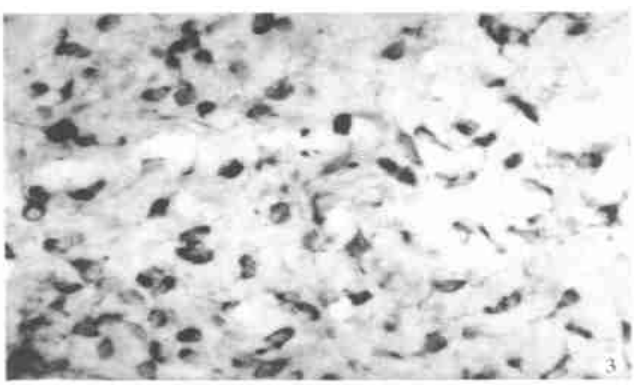
**Fig 1　Distribution of synapse around neuron in the medial preoptic area in control group**　(TEM× 5 000)

图 2　EB 组: 神经元核膜出现皱折、细胞周围突触明显增多　(TEM× 5 000)

**Fig 2　Nuclear membranes folded, synapse became richer in EB group**　(TEM× 5 000)

### 2.2　视前内侧区、弓状核 ER-IR 变化

大鼠视前内侧区、弓状核均可见 ER-IR 细胞广泛分布, ER-IR 主要分布于胞核, 部分神经元胞浆可见 ER 分布。用 β-雌二醇后发现以上区域 ER-IR 含量明显下降(与对照组比较差异显著, $P<0.05$), 见图 3、4, 表 1(反应阳性物的面积计算为实测反应阳性物面积值× 0.5282× $10^{-3}mm^2$)。



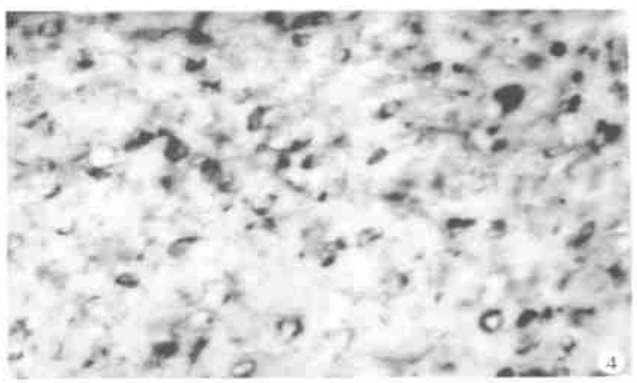


图 3　对照组: ER-IR 细胞分布, ER 主要位于细胞核　(S-P× 200)

**Fig 3　ER mainly located in nucleus in control group**　(S-P× 200)

图 4　EB 组: ER-IR 细胞含量明显减少　(S-P× 200)

**Fig 4　ER-IR cells was obviously decreased in EB group**　(S-P× 200)

表 1　ER-IR 神经元的面积及光密度($\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Area and IOD of ER-IR neuron($\bar{x}\pm s$)**

| Group | Medial Preoptic Area | | Arcuate Nuclei | |
|---|---|---|---|---|
| | Area ($mm^2$) | IOD | Area ($mm^2$) | IOD |
| Control | 14.16±3.93 | 15.49±4.72 | 11.54±3.28 | 14.50±2.17 |
| EB | 10.37±7.6* | 9.70±5.2* | 6.35±2.01* | 6.43±7.51* |

*: $P<0.05$ *vs* control

## 3　讨论

老年前期大鼠开始出现动情周期延长, 之后持续动情, 反复假妊娠, 最后进入老年无动情状态。在其血清性激素、促性腺激素水平、动情周期、卵巢子宫形态方面与妇女更年期表现极为相似, 可用作生殖内分泌系统衰老研究的动物模型[8]。通过阴道细胞学检查发现, 本试验选用 18 月龄雌性 Wistar 大鼠出现动情周期不规律状态, 宜用作更年期雌激素替代治疗模型。

### 3.1　雌激素对视前内侧区、下丘脑神经元结构的影响

性类固醇激素能改变成年动物神经元结构[9], 研究证实雄激素能增加动物下丘脑视前区神经元树突的长度[10]。卵巢类固醇激素对雌性小鼠额叶皮层神经元超微结构可产生影响, 增加树突长度及树突内微管

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

数[11]。本研究发现应用雌激素后视前侧区、弓状核神经元核仁边移，核膜皱折，神经毡部位见突触增多，突触内分泌小泡增多，提示应用雌激素后明显增加视前内侧区、弓状核神经元的分泌功能。性类固醇激素在脑发育阶段发挥着重要作用，调节神经发育和神经环路的形成。动物实验发现，雌激素调节下丘脑腹外侧核、弓状核中神经肽、促生长抑素、神经降压肽、P物质水平[12]。神经元间通过突触相互联系，使神经冲动定向传导。应用雌激素后突触增多，提示神经元间相互联系增强。

近年来对突触小泡内所含递质作了大量的生物化学研究发现，突触小泡内含有大量的神经递质，如：乙酰胆碱、去甲肾上腺素、谷氨酸、γ-氨基丁酸和多巴胺等[13]。应用雌激素后突触小泡明显增多，可能为雌激素影响了神经元的分泌功能，增加神经递质的释放[4]。机体衰老时垂体内分泌功能的紊乱与下丘脑尤其是下丘脑弓状核调节功能发生年龄性损害密切相关，衰老过程中下丘脑所出现的一系列结构和功能改变为导致机体神经内分泌系统功能紊乱的主要原因[5]。本研究发现对照组弓状核神经细胞多聚核蛋白体明显减少，神经元胞质内发现脂褐素颗粒符合老年前期大鼠弓状核神经元的形态特点。用雌激素后神经元胞浆内游离核糖体增多，细胞器丰富，提示雌激素影响弓状核神经元的分泌功能。弓状核神经内分泌细胞可合成各种促激素释放激素，产生神经递质——多巴胺，它们共同协调完成机体神经内分泌系统调节[14]。雌激素影响弓状核神经细胞的结构，推测其将影响神经元的分泌功能。多巴胺可直接作用于心血管。雌激素是否通过影响多巴胺等神经递质的释放影响心血管功能仍需进一步研究。

### 3.2 雌激素对下丘脑雌激素受体的影响

雌激素主要通过与ER结合发挥作用。在活体内应用放射自显影的方法已发现在哺乳动物有雌激素集聚的神经元。这些神经元主要分布于视前区、下丘脑及中脑的中央灰质[14]。本研究发现，在老年前期，雌性大鼠视前内侧区、下丘脑弓状核发现大量的含ER免疫反应物的神经元，提示雌激素可作用于以上区域。视前内侧区的功能与性分化相关，性激素可影响该部分神经元的形态及数量。而下丘脑弓状核为重要的促垂体区，在下丘脑-垂体-卵巢轴调节中起重要作用。

综合以上，本研究发现，雌二醇可下调老年前期大鼠视前内侧区、下丘脑弓状核ER-IR的含量，并对该部分神经元结构产生影响，使细胞核仁边移、核膜形成皱折，突触增多、突触小泡丰富。增加神经元间的物质交换及神经元的分泌功能。提示，β-雌二醇可通过调控视前内侧区、弓状核雌激素受体的变化，进一步影响该部分神经元结构功能。视前内侧区、下丘脑弓状核与心血管疾病的形成相关，雌激素可能通过影响视前内侧区，弓状核神经元结构及功能进一步影响心血管的功能。

参考文献：


[1] Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. Science, 1988, 240(6): 889—895.

[2] Simerly S, Chang C, Muramatsu M, *et al*. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study[J]. J Comp Neural, 1990, 294(1): 76—95.

[3] Blaustein J D. Cytoplasmic estrogen receptors in rat brain: immunocytochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes[J]. Endocrinology, 1992, 131(3): 1 336—1 342.

[4] Dufourny L, Warembourg M. Estrogen modulation of neuropeptides: somatostatin, neurotensin and substance P, in the ventrolateral and arcuate nuclei of the female guinea pig[J]. Neurosci Res, 1999, 33(3): 233—238.

[5] Miller M M, Bennett H P, Billior R B, *et al*. Estrogen, the ovary, and neurotransmitters: factors associated with aging[J]. Exp Gerontol, 1998, 33(7—8): 729—757.

[6] 程化奇，熊舜华，殷新尤，等. 大鼠更年期实验模型研究[J]. 上海实验动物学，1993, 13(4): 192—196.

[7] 王小明，林宇清，张 颖，等. 雌激素对雌性大鼠心肌蛋白激酶A活力的影响[J]. 生殖医学杂志，1996, 5(1): 21—24.

[8] 王平宇，张凤真. 大鼠脑读片提要及图谱[M]. 西安：西北大学出版社，1995. 8—11, 36—38.

[9] Motta P M. Ultrastructure of endocrine cell and tissue[M]. Boston: Martiuus Nijhoff Publishers, 1984. 12—76.

[10] Lu K H, Hopper B R, Vargo T M, *et al*. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive state[J]. Biol Reprod, 1979, 21(1): 193—203.

[11] 章子贵，杜红燕，姜建明，等. 衰老过程中小鼠学习记忆与脑内突触结构参数变化的相关性[J]. 神经解剖学杂志，1998, 1(2): 147—151.

[12] Devoogd T, Nottebohm F. Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain[J]. Science, 1981, 214(3): 202—246.

[13] 李云生，田德润，任学军，等. 卵巢类固醇激素对雌性小鼠额叶皮质神经元超微结构的影响[J]. 解剖学杂志，1996, 19(4): 312—315.

[14] 刘建康，李庆明. 大鼠下丘脑弓状核年龄性变化的电镜观察[J]. 神经解剖学杂志，1992, 8(2): 217—220.


（编辑 冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net